

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA – UFPB
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS – CAA
CURSO DE BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**USO DE CÉLULAS TRONCO AUTÓLOGAS DE TECIDO ADIPOSEO EM CÃO COM
APLASIA MEDULAR (RELATO DE CASO)**

PAULO RICARDO MEDEIROS SANTANA

AREIA 2017

PAULO RICARDO MEDEIROS SANTANA

Aluno de Graduação em Medicina Veterinária

**TRATAMENTO COM CÉLULAS TRONCO EM UM ANIMAL COM APLASIA
MEDULAR (RELATO DE CASO)**

Trabalho de Conclusão de Curso do curso de Graduação "Lato Sensu" em Medicina Veterinária apresentado à UFPB como requisito parcial para a obtenção de título de Bacharel em Medicina Veterinária, sob a orientação do Professor Dr. Ricardo Romão Guerra.

Areia, 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

Paulo Ricardo Medeiros Santana

**USO DE CÉLULAS TRONCO AUTÓLOGAS DE TECIDO ADIPOSEO EM CÃO COM
APLASIA MEDULAR: RELATO DE CASO**

Trabalho de conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em **Medicina Veterinária**, pela Universidade Federal da Paraíba.

Aprovado em ____/____/____.

Nota:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Ricardo Romão Guerra, Doutor - UFPB
Orientador

Ricardo Barbosa Lucena, Doutor - UFPB

José Ferreira da Silva Neto, Mestrando – UFPB

Dedico este trabalho a todos aqueles que nos ajudaram na sua execução e na realização deste curso.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por mais essa vitória.

Agradeço aos meus pais, em especial a minha mãe, pela ajuda e incentivo que me deram com seus exemplos de luta e perseverança, fazendo com que vencesse os momentos mais difíceis da caminhada em busca de mais conhecimento profissional, e aos meus irmãos, tios(as), primos(as) como parte integrante na união da família que é a mola que impulsiona a vida.

Agradeço aos meus amigos, Alvaro Lima, Camila Ingrid, Yanna Nascimento, Natália Carolina, Edlaine Pinheiro, Lucas Rodrigues (Gogó de sola), Allan Gledson, Maria Kobayashi, Yasmim Santos, Davi Oliveira, Danillo Marte, Neto Ferreira, Wesley Leonardo Araújo, Custódio Miranda, Ivana Fernandes, Thyago Araújo, Tereza Rotandanto pelo apoio incondicional durante todo esse tempo de união e especialmente na realização deste curso.

Agradeço a meu orientador, Ricardo Romão Guerra, pela sua ajuda na realização deste trabalho.

A Gisele Castro como minha co-orientadora.

Agradeço aos colegas que juntos no decorrer do curso, compartilhando ideias, alegrias, emoções e incertezas nos tornamos amigos.

Enfim, agradeço a todos aqueles que acreditaram em mim.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mórula intracelular de <i>E.canis</i> em monócito	12
Figura 2. Fotomicrografias de células infectadas por mórulas de <i>Ehrlichia canis</i>	13
Figura 3. O paciente, Buldog Frânces.....	26
Quadro 1. Classificação da ordem Rickettsiales.....	11
Tabela 1. Hemograma do terceiro encontro	27
Tabela 2. Hemograma do quarto encontro	27
Tabela 3. Hemograma do quinto encontro	28
Tabela 4. Bioquímica do quinto encontro	28
Tabela 5. Hemograma do sétimo encontro	29
Tabela 6. Hemograma do oitavo encontro	29
Tabela 7. Comparação dos hemogramas durante todo o tratamento	33

RESUMO

SANTANA, Paulo Ricardo Medeiros, **Universidade Federal da Paraíba, Junho de 2016. USO DE CÉLULAS TRONCO AUTÓLOGAS DE TECIDO ADIPOSEO EM CÃO COM APLASIA MEDULAR.** Orientador: Ricardo Romão Guerra.

Aplasia medular (também conhecida como anemia aplásica) é relativamente rara em cães e gatos e caracteriza-se por uma pancitopenia em sangue periférico e uma hipoplasia de três linhagens celulares (eritróide, mielóide e megacariocítica) na medula óssea, resultando na substituição de tecido hematopoiético por tecido adiposo. Existe ainda uma classificação de acordo com a apresentação e evolução das citopenias em sangue periférico e hipoplasia medular, caracterizando a aplasia como aguda ou crônica. O presente trabalho teve por objetivo relatar o tratamento com células tronco para uma pancitopenia causada por Erliquiose canina, em cão de 4 anos e 6 meses de idade, pesando 10,6kg em uma clínica veterinária – Campina Grande, PB. Durante a primeira avaliação clínica observou-se mucosas ocular e oral pálidas, severa dermatite, levemente anorético, e segundo a sua tutora com diagnóstico de Erliquiose canina elucidado em outra clínica veterinária. Então, optou-se por realizar novos exames complementares, tais como hemogramas, os quais, sempre resultava em Anemia Microcítica Hipocrômica regenerativa, leucograma com leucopenia por Linfocitopenia, Monocitopenia absolutas Degenerativa severa, e no plaquetograma apresentava trombocitopenia, bioquímicos com resultados normais, imunofluorescência indireta para cinomose, urinálise, e pesquisa de hematozoários. Na pesquisa por hematozoários diagnosticou-se a presença de mórulas de *Ehrlichia spp.* em linfócitos do paciente. Diante desse diagnóstico. Foi instituído o seguinte tratamento, Omeprazol, Doxiciclina, Suplemento Nutricional, Timerovac, ivermectina e clorexidina 3g. Porém o tratamento, não resultou em melhora, foi escolhido um novo tratamento utilizando implante com células tronco, produzidas a partir do tecido adiposo do próprio animal. Porém o animal morreu por parada cardiorrespiratória. Sendo assim, novos estudos nessa área são de grande importância para novas descobertas que venham a buscar tratamento e alternativas para cães com Erliquiose crônica. Objetivou-se descrever um caso de um cão com Erliquiose canina crônica tratado com células tronco.

Palavras-chave: cão, Erliquiose canis, prevenção, tratamento.

ABSTRACT

SANTANA, Paulo Ricardo Medeiros, Federal University of Paraíba, June 2016. USE OF AUTOLOGICAL TRONCO CELLS OF ADIPOSEOUS TISSUE IN DOG WITH APLASIA MEDULAR. Advisor: Ricardo Romão Guerra

Medullary aplasia (also known as aplastic anemia) is relatively rare in dogs and cats and is characterized by peripheral blood pancytopenia and hypoplasia of three cell lines (erythroid, myeloid and megakaryocytic) in the bone marrow, resulting in the replacement of hematopoietic tissue by adipose tissue. There is also a classification according to the presentation and evolution of cytopenias in peripheral blood and medullary hypoplasia, characterizing aplasia as acute or chronic. The aim of the present study was to report the treatment with stem cells for pancytopenia caused by canine Erythiliasis, in dogs of 4 years and 6 months of age, weighing 10.6kg in a veterinary clinic - Campina Grande, PB. During the first clinical evaluation, pale ocular and oral mucosa, severe dermatitis, slightly anorexic, and according to her guardian with diagnosis of canine Erythemia elucidated in another clinic were observed. Therefore, new complementary exams such as hemograms were used, which always resulted in regenerative hypochromic microcytic anemia, leukopenia with leukopenia due to lymphocytopenia, absolute degenerative monocytopenia, and in thrombocytopenia, biochemical with normal results, indirect immunofluorescence for distemper, urinalysis, and hematopoietic screening. In the hematozoan research the presence of *Ehrlichia spp.* In the patient's lymphocytes. Faced with this diagnosis. The following treatment was instituted, Omeprazole, Doxycycline, Nutritional Supplement, Timerovac, ivermectin and chlorhexidine 3g. However the treatment did not result in improvement, a new treatment was chosen using a stem cell implant, produced from the animal's own adipose tissue. But the animal died from cardiorespiratory arrest. Therefore, new studies in this area are of great importance for new discoveries that come to seek treatment and alternatives for dogs with chronic Erythroblastoma. The objective of this study was to describe a case of a dog with chronic canine Erliquiosis treated with stem cells.

Key words: dog, prevention, , treatment, stem cells.

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

BID – bis in die (duas vezes ao dia)

dL – decilitro

et al – e colaboradores

g – grama

I.M. – via intramuscular

I.V. – via intravenosa

kg – quilograma

mg – miligrama

mL – mililitro

S.C. – via subcutânea

SID – semel in die (uma vez ao dia)

TID – ter in die (três vezes ao dia)

TPC – tempo de preenchimento capilar

VO – via oral

° C – graus Celsius

ALT – Alanina Aminotransferase

FA – Fosfatase Alcalina

CT – Células tronco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	09
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 ERLQUIOSE CANINA	11
2.1.2. EPIDEMIOLOGIA	14
2.1.3. PATOGENIA	15
2.1.4. SINAIS CLÍNICOS	16
2.1.5. DIAGNÓSTICOS	17
2.1.6. TRATAMENTO	18
3. APLASIA MEDULAR	20
4. CÉLULAS TRONCO	21
5. APRESENTAÇÃO DO CASO CLÍNICO	26
5.1. RELATO DE CASO	26
6. DISCUSSÃO	31
7. CONCLUSÃO	34
8. REFERÊNCIAS	35

1. INTRODUÇÃO

Todas as células sanguíneas têm um tempo de vida útil e são renovadas por toda a vida do animal. Notavelmente, todas são oriundas em última análise, a partir de uma célula-tronco comum, na medula óssea. Assim, esta célula-tronco, denominada hematopoiética, é multipotente, e tem a capacidade de dar origem a todos os tipos de células sanguíneas diferenciadas. (MALARD *et al.*, 20015.)

A Aplasia medular ou anemia aplásica, é uma pancitopenia de sangue periférico e uma hipoplasia das células eritróides, mielóides e megacariocítica, pertencentes a medula óssea, onde será substituída por tecido adiposo. Para tal acometimento há várias causas, tais como: idiopáticas (por exclusão), induzidas, infecciosas.

As principais aplasias medulares de origem infecciosa em cães são relacionadas à *Ehrlichia canis* e parvovírus (WEISS *et al.*, 1999). As citopenias periféricas relacionadas à Erliquiose ocorrem tanto na fase aguda quanto na fase crônica da doença. Na fase aguda a medula está hipercelular, devido a uma hiperplasia mielóide, sugerindo que a citopenia é de origem periférica, resultante da destruição celular. Na fase crônica a citopenia observada é de origem medular, resultante da aplasia aguda ou crônica, devido a uma hipoplasia medular de todos os precursores celulares (FELDMAN, 2005).

Para o tratamento *Ehrlichia canis*, Brandão (2010), preconiza o uso da doxiciclina na dose de 5mg/kg, BID, por 21 dias. Já outros autores com Chaves, Leite, Naveca (2007), citam a dose de doxiciclina de 10mg/kg/SID, via oral, durante 28 dias como o tratamento de eleição. Entretanto Valera (2003), cita a mesma dose e tempo de tratamento, porém inclui a possibilidade de administração de 12 em 12 horas.

Em análises laboratoriais o hemograma caracteriza-se por uma anemia arregenerativa normocítica, normocrômica, leucopenia por neutropenia e trombocitopenia. Quando mais de 75% de gordura compõem a medula de um cão adulto, somado a redução ou ausência dos três tipos celulares (eritróide, mielóide e megacariocítica) pode-se considerá-la aplásica. (HARVEY, 2001).

Embora a para diagnóstico a punção aspirativa seja feita com maior frequência, a biopsia medular ainda é a melhor forma de fechar o diagnóstico, uma vez que, avalia melhor se há metástase medulares, como também, avaliação de celularidade.

Desde a década de 70, a aplicação de terapia celular com células tronco no tratamento de doenças hematológicas já possuía sólidas bases experimentais e clínicas. Essas doenças são muito comuns nos animais e com rápida evolução no quadro clínico. (MALARD *et al.*, 2015)

Células-tronco são células indiferenciadas, tendo como alta capacidade de renovação e de se diferenciar em diversos tipos celulares, como também, acredita-se que devido a essas propriedades, elas tenham um papel regenerativo quando os tecidos sofrem lesão ou injúria.

Embora, atualmente haja estudos tanto sobre as células-tronco originárias da medula óssea, como também das de origens mesenquimais (células estromais mesenquimais multipotentes), as células-tronco de origem medular sempre foram as mais estudadas. No entanto, na última década houve um “bull”, nos estudos as de origem mesenquimais, devido a sua facilidade de obtenção, quanto ao seu poder de replicação e plasticidade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. ERLICHIOSE CANINA

A erliquiose canina é uma enfermidade que provoca imunossupressão em cães domésticos e canídeos silvestres. É causada por um hemoparasito do gênero *Ehrlichia* sp., que faz parte de um grupo de bactérias conhecidas como rickettsias, da ordem Rickettsiales, família Anaplasmataceae. Análises genéticas recentes, que tiveram início em 2001, proporcionaram ampla reclassificação e renomeação taxonômica de bactérias classificadas nos gêneros *Ehrlichia*, *Rickettsia*, *Anaplasma*, *Cowdria*, *Wolbachia* e *Neorickettsia*, que levaram a uma nova classificação e mudança de gêneros de várias destas bactérias. (SHIBATA et al., 2000; DUMLER et al., 2001; D’AGNONE; 2009)

Atualmente, o gênero *Ehrlichia* compreende cinco espécies válidas: *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris* e *E. ruminantium*. Além destas, uma possível sexta espécie de erliquia foi identificada no Japão, tendo sido isolada do carrapato *Ixodes ovatus*, e denominada como *Ehrilichia* OIE (SHIBATA et al., 2000; DUMLER et al., 2001; D’AGNONE; 2009)

Quadro 1. Classificação da ordem Rickettsiales.

Ordem	Rickettsiales
Família	Anaplasmataceae
Gênero	Espécie
<i>E. canis</i> <i>E. chaffeensis</i>	
EHRlichia <i>E. muris</i> <i>E. ruminantium</i> <i>A. platys</i> <i>A. phagocitophila</i>	<i>E. ewingii</i>
ANAPLASMA <i>A. marginale</i> <i>A. ovis</i> <i>A. bovis</i> <i>N. risticii</i>	<i>A. centrale</i>
NEORICKETTSIA <i>N. helminthoeca</i>	<i>N. sennetsu</i>
WOLBACHIA	<i>W. pipientes</i>

Copilado de DUMLER et al., (2001)

Porém, dentre estas, *E. canis* é o agente que mais comumente afeta os cães, causando um quadro clínico mais severo, tendo maior importância epidemiológica. Apesar disso, várias espécies de *Ehrlichia* podem causar infecção clínica e subclínica em cães. São parasitas intracelulares obrigatórios que infectam leucócitos (monócitos e polimorfonucleares) ou trombócitos (plaquetas) e causam trombocitopenia no hospedeiro (OLICHESKI, *et al.*, 2003; CHAVES; LEITE; NAVECA, 2007).

Este hemoparasita infecta os monócitos circulantes dentro do citoplasma formando agregados intracelulares denominados “mórulas” (Figuras 07 e 08). Estas mórulas compreendem um conjunto de microorganismos firmemente envoltos por uma membrana. As células infectadas se distribuem pelo organismo através da circulação do sangue e pelas vias linfáticas (DUMLER *et al.*, 2001; ADRIANZÉN *et al.*, 2003).



Figura 1: Mórula intracelular (seta) de *E.canis* em monócito. Exame citológico de ponta de orelha. Fonte: VARELA *et al.*, 2003.

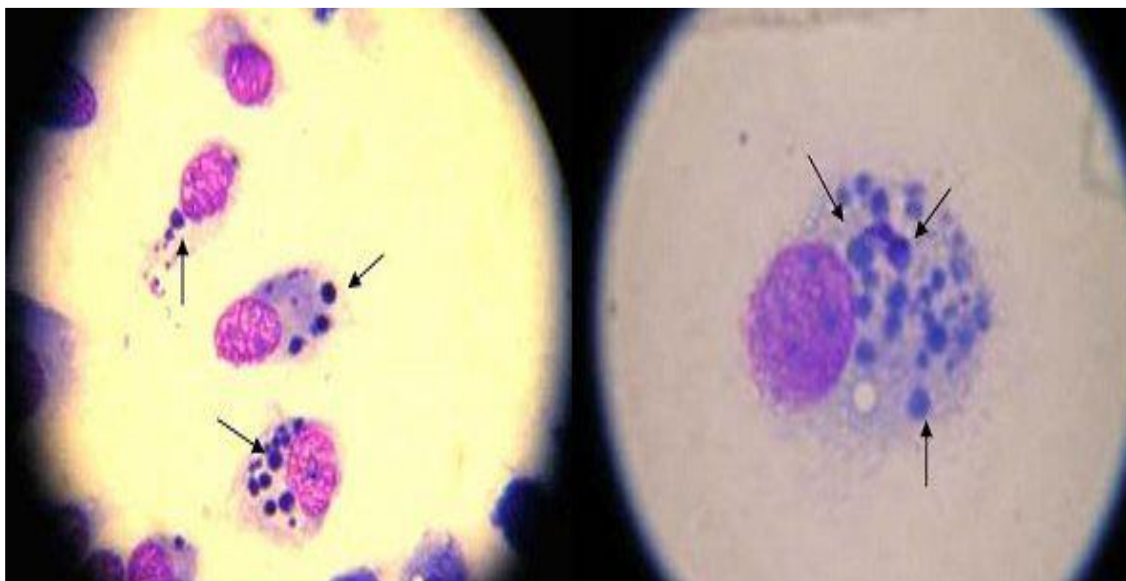


Figura 2: Fotomicrografias de células DH821 infectadas apresentando mórulas de *Ehrlichia canis* (setas). Coloração por panótico rápido (Laborclin®); objetiva de 100X. Fonte: AGUIAR et al., 2007.

A erliquiose canina é transmitida aos cães pelo *Rhipicephalus sanguineus*, principal transmissor da babesiose canina no Brasil, sendo transmitida em todos os estágios de desenvolvimento do carrapato (CHAVES; LEITE; NAVECA, 2007).

A transmissão da doença ocorre de forma mecânica, sendo transmitida através da saliva do carrapato vetor, pela picada destes durante o repasto sanguíneo, e estes se infectam ao se alimentarem de um hospedeiro infectado, pela ingestão de leucócitos infectados de cães na fase aguda da doença, e se disseminam pelo organismo do carrapato através dos hemócitos do intestino, indo para a glândula salivar. Os carrapatos sobrevivem como adultos sem se alimentarem entre 155 a 568 dias, podendo transmitir a infecção por até 155 dias após se tornarem infectados. Outra forma de transmissão é através de transfusões de sangue infectado, que podem ocasionar altas taxas de infecção iatrogênica (LEGATZKI; Jorge, 2002; ADRIANZÉN *et al*, 2003; TILLEY; SMITH JR, 2003; D'AGNONE, 2006; CHAVES; LEITE; NAVECA, 2007).

Após a entrada no hospedeiro canino, a primeira replicação das erliquias ocorre nas células mononucleares e nos linfócitos. O hemoparasita penetra na parede celular através de fagocitose e, uma vez dentro da célula hospedeira, inibe a formação do fagolisossomo, desenvolvendo-se dentro deste. A princípio, no interior de monócitos e neutrófilos são observados corpúsculos elementares iniciais com 0,5 a 1µm, que depois se multiplicam por divisão binária formando uma inclusão que recebe o nome de mórula, e que mede 1 a 2 micras de diâmetro. Quando maduras, as mórulas se

dissociam em novos corpúsculos elementares, que deixam as células por exocitose ou por lise das mesmas, seguindo para parasitar novas células (MENDONÇA *et al.*, 2005; PEREIRA, 2006; CHAVES; LEITE; NAVECA, 2007).

Segundo Machado (2004) e Greene (2005), geralmente é de 8 a 20 dias o período de incubação da infecção por *E. canis*. A manifestação da doença se dá nas fases subclínica, aguda e crônica, caracterizadas por anormalidades clínicas e hematológicas. É bastante variável a idade dos cães acometidos pela erliquiose, sendo relatados casos da enfermidade em cães de dois meses até treze anos de idade (WADDLE e LITTMAN, 1987; ELIAS 1991; NEER e HARRUS, 2006; MANOEL, 2010).

2.1.2. EPIDEMIOLOGIA

A erliquiose canina também recebe outras denominações, como: enfermidade do cão rastreador, pancitopenia canina tropical e febre canina hemorrágica. É uma doença cosmopolita, com especial ocorrência em áreas tropicais e subtropicais, que desenvolve-se mais em épocas quente; o vetor já bem adaptado a regiões urbanas, o que facilita sua transmissão aos animais domésticos

A erliquiose foi identificada pela primeira vez por Donatien e Lestoquard, em (1935), em um cão Pastor Alemão, na Argélia. O parasita foi classificado como *Ehrlichia canis*, em 1945, por Mashkovsky, porém, apenas na década de 70, a espécie *Ehrlichia canis* se tornou familiar nos centros urbanos.

A *E. canis* foi documentada pela primeira vez no Brasil em 1973, em Belo Horizonte e, desde então, a doença vem sendo registrada em vários estados do país, acometendo aproximadamente 20 a 30% dos cães atendidos em hospitais e clínicas veterinárias (D'AGNONE; MORAIS; VIDOTTO, 2003; BULLA *et al.*, 2004a; AGUIAR, 2006; D'AGNONE, 2006; CHAVES; LEITE; NAVECA, 2007).

Animais com infecção crônica e carrapatos que permanecem infectados por longos períodos podem ser reservatórios de *E. canis*. Cães com erlichiose também podem estar infectados concomitantemente por *Babesia spp.* e *Hepatozoon spp.*, uma vez que esses organismos também são transmitidos pela mesma espécie de carrapato (SOUSA *et al.*, 2004; PEREIRA, 2006).

Atualmente sabe-se que a erliquiose é uma zoonose, onde carrapatos infectados podem transmitir *Ehrlichia spp.* aos humanos. Animais domésticos podem carrear carrapatos infectados para o ambiente doméstico e, com isso, estes contaminarem

humanos através de sua picada. Também é importante observar que a condição da doença subclínica em cães por tempo prolongado sugere que estes animais têm potencial para serem hospedeiros reservatórios de carrapatos infectados, podendo transmitir a doença para pessoas (SHERDING, 2008).

2.1.3. PATOGENIA

Animais que uma vez contraíram erliquiose não desenvolvem imunidade protetora, sendo assim, mesmo animais já tratados, quando expostos novamente ao vetor contaminado, podem contrair a enfermidade e esta reinfecção tanto pode ser semelhante à anterior, quanto de forma mais branda ou mais intensa (LEGATZKI; JORGE, 2002).

A erliquiose canina provoca imunossupressão em cães e canídeos silvestres e este microorganismo infecta os monócitos circulantes dentro do citoplasma formando as mórulas. As células infectadas se distribuem pelo organismo através da circulação do sangue e pelas vias linfáticas (ADRIANZÉN *et al*, 2003).

Após a transmissão do parasito ao cão pelo carrapato, a erliquiose tem um período de incubação de 8 a 20 dias, porém este período varia com a dose de microorganismos infectantes, ou seja, quanto maior a dose de parasitas, menor o período de incubação. Entretanto, as alterações patológicas e clínicas não são influenciadas pela dose infectante (OLICHESKI, 2003).

A *Ehrlichia* pode ser dividida em duas classes, de acordo com o tipo celular que infecta, podendo ser classificadas como monocitrópicas ou trombocíticas. As monocitrópicas infectam principalmente monócitos circulantes e fagócitos mononucleares nos linfonodos, baço, fígado e medula óssea, causando hiperplasia linforreticular disseminada, organomegalia (linfadenomegalia, esplenomegalia e hepatomegalia) e anormalidades hematológicas. Estas são as *Ehrlichia chaffeensis*, *E. canis* e *E. ruminantum*. Já demais são classificadas como trombocíticas e parasitam trombócitos, causando essencialmente uma trombocitopenia cíclica e não clínica (BIBERSTEIN; HIRSH, 2003; SHERDING, 2008).

Secundário ao processo de vasculite ocorre a destruição periférica das células alvo, ou sequestro das mesmas, agravando a trombocitopenia e leucopenia. A trombocitopenia se deve a diminuição da meia-vida das plaquetas, resultante de sua destruição, que decorre da estimulação dos sistemas imunológico e de coagulação, em consequência da resposta inflamatória (OLICHESKI, 2003).

Na fase aguda também se observa um aumento no tempo de coagulação, devido à inibição da agregação plaquetária. Esta inibição provavelmente se dá devido a presença de anticorpos antiplaquetas no soro de cães infectados com *E. canis*. O animal pode recuperar-se totalmente, passar para a fase subclínica, ou morrer, sendo esta uma condição mais rara de ocorrer. Em geral o animal morre em decorrência de associação da erliquiose com outras doenças concomitantes (OLICHESKI, 2003).

Normalmente, após uma fase de infecção aguda transitória, os cães contaminados livram-se da infecção ou, no caso de infecção por *E. canis*, passam por uma fase subclínica prolongada, que pode se estender por meses ou até anos, até que finalmente manifestem os sintomas da doença em fase crônica. Por este motivo, a maior parte das infecções por *E. canis* só é diagnosticada nesta fase (SHERDING, 2008).

A principal característica da fase crônica da erliquiose é o aparecimento de hipoplasia medular, que leva a uma anemia aplásica, com monocitose, linfocitose e leucopenia (OLICHESKI, 2003).

2.1.4. SINAIS CLÍNICOS

As manifestações clínicas são inespecíficas (WANER; STRENGER; KESARY, 2000), porém os sinais comuns em erliquiose são a apatia, inapetência, hipertermia, mucosas pálidas e hemorragia, linfadenopatia, esplenomegalia e uveítes (NAKAGH et al., 2008).

Alguns autores relatam que os sinais clínicos nos cães afetados cronicamente variam de moderado a severo, enquanto que para Almosny (2002) são reflexos das alterações fisiopatológicas resultantes da grave anemia e da infiltração perivascular de muitos sistemas orgânicos, com células linforreticulares e plasmócitos.

Os sinais clínicos dessa enfermidades são inespecíficos e os mais variados, tais como: tosse, conjuntivite, uveíte bilateral, hemorragia retinal, vômito, depressão, ataxia, disfunções vestibulares, hiperestasia generalizada ou localizada, tremores intencionais na cabeça, paraparesia ou tetraparesia, déficit nervoso cranial, opistótono, hiperestasia e nistágmo, dermatopatias, tosse, conjuntivite, uveíte bilateral, hemorragia retinal, vômito, depressão, ataxia, disfunções vestibulares, hiperestasia generalizada ou localizada, tremores intencionais na cabeça, paraparesia ou tetraparesia, déficit nervoso cranial, opistótono, hiperestasia e nistágmo.

2.1.5. DIAGNÓSTICOS

O diagnóstico pode ser clínico e/ou laboratorial, onde o diagnóstico clínico é realizado através da suspeita pelos sintomas. O diagnóstico laboratorial se dá através de hemograma, exames bioquímicos e urinálise. No exame hematológico identifica-se trombocitopenia, anemia normocítica, normocrômica, eosinopenia, linfopenia e desvio nuclear de neutrófilos à esquerda, sendo estes achados predominantes durante a infecção por *E. canis* (NELSON; COUTO, 2001; MENDONÇA *et al.*, 2005).

O diagnóstico laboratorial mais comum é realizado através da observação de mórulas em esfregaços de sangue periférico, de ponta de orelha. Porém, a baixa sensibilidade do exame de hemocitozoários nas fases subaguda e crônica é devido à dificuldade de visualização de corpúsculos e mórulas por causa da baixa parasitemia (MOREIRA *et al.*, 2005). Quando isto ocorre, faz-se necessário a inclusão de testes sorológicos, como a técnica de imunofluorescência indireta, e/ou PCR, este especialmente para detectar a espécie envolvida (ALMOSNY; MASSARD, 2002; LIBERATI *et al.*, 2009).

Outra técnica que pode ser utilizada é o aspirado de medula óssea, na fase crônica, o que geralmente revela uma hipocelularidade acentuada, raros megacariócitos e elementos eritrócitos e mielóides ocasionais. A hipoplasia mielóide, eritóide e megacariocítica presente na fase crônica estão associadas à hiperplasia linfóide e de plasmócitos (NELSON, COUTO, 2001).

Segundo Almosny (1998), o diagnóstico pelo método de ELISA é prático e o mais barato, porém resultados falso-positivos são frequentes, já que este método detecta anticorpos, resultando em um diagnóstico positivo indicando que o animal está ou esteve em contato com o antígeno.

É importante realizar um diagnóstico diferencial com babesiose para excluir a possibilidade desta infecção, visto terem semelhança clínica, ou constatar uma concomitância das doenças, o que é comum, visto possuírem o mesmo carrapato como vetor. Essa identificação pode ser constatada através de exame hematológico, com evidenciação da *Babesia ssp.* nos eritrócitos (CHAVES; LEITE; NAVECA, 2007).

Cães em fase crônica de erliquiose apresentam sintomas semelhantes a intoxicação por estrógenos, pancitopenia imunomediada e doenças associadas a disfunções de órgãos específicos, como glomerulonefrites, além de assemelhar-se ao mieloma múltiplo ou leucemia linfocítica crônica (OLICHESKI, 2003).

2.1.6. TRATAMENTO

As tetraciclinas e seu derivado doxiciclina constituem as drogas de escolha para os cães com erliquiose, porém Couto (2003) expressa sua preferência pela doxiciclina, sugerindo a dose de 2,5 a 5 mg/kg, VO, a cada 12 a 24 horas por 10 a 14 dias.

Já Olicheski (2003) relata que a literatura cita várias dosagens e tempo de duração diferentes para o tratamento da erliquiose com doxiciclina. Por exemplo, autores utilizam a dosagem de 5 mg/kg ao dia por 7 a 10 dias na fase aguda e 10 mg/kg ao dia por 7 a 21 dias na fase crônica, enquanto alguns recomendam prolongar o tratamento por mais de 6 semanas, no caso de erliquiose subclínica.

A doxiciclina é uma clortetraciclina e apresenta eficácia clínica com poucos efeitos colaterais. Pode ser administrada em animais com disfunção renal, já que é excretada pelo trato gastrointestinal. É absorvida com rapidez quando administrada por via oral, sendo sua distribuição ampla pelo coração, rins, pulmões, músculo, fluido pleural, secreções brônquicas, bile, saliva, fluido sinovial, líquido ascítico e humores vítreo e aquoso. Além disso, é mais lipossolúvel e penetra nos tecidos e fluidos corporais melhor que o cloridrato de tetraciclina e a oxitetraciclina (ANDRADE; SANTARÉM, 2002).

Porém em (TJWA, *et al.* 2009), afirma que, em estudos recentes revelaram que a recuperação hematopoética após a administração do mielotóxica agente de 5-fluorouracilo (5-FU) requer MMP-9, também conhecido como gelatinase B⁴. Portanto, investigamos se os antibióticos tais como doxiciclina pode prejudicar a recuperação hematopoética após quimioleblação. Estes dados sugerem que doxiciclina compromete a recuperação hematopoiética através da inibição destas MMPs, embora não podemos excluir a possibilidade doxiciclina, que pode atuar através de MMP-independente.

Já Pereira (2006) não recomenda o uso de tetraciclinas em cães com menos de 6 meses de idade, pois provoca escurecimento permanentemente dos dentes. Em cães com insuficiência renal seu uso também não é indicado. O cloranfenicol pode ser utilizado em cães com infecção persistente e refrataria a terapia com tetraciclinas, podendo ser utilizado em filhotes com menos de cinco semanas para evitar o escurecimento do esmalte dentário, utilizando a dose de 50 mg/kg de oito em oito horas por 15 dias, via oral, subcutânea ou intravenosa, não sendo recomendado seu uso em animais com anemia.

Olicheski (2003) afirma que a duração da terapia é tão importante quanto a dosagem ou o quimioterápico utilizado, e diz que o tratamento deve persistir por pelo

menos 3 a 4 semanas, nos casos que respondem eficazmente, e por períodos ainda maiores, acima de 8 semanas, em casos de animais que estão na fase crônica da doença.

Uma fase importante do tratamento também é instalar uma terapia de suporte, principalmente nas fases crônicas da doença, o que inclui, dependendo da gravidade de cada caso: fluidoterapia, transfusão sanguínea e suplementos vitamínicos. Em alguns casos pode ser necessário administrar antiinflamatórios ou imunossupressores, como a prednisolona, na dose sugerida de 2,2mg/kg via oral BID, por 3 a 4 dias. Se houverem infecções bacterianas secundárias deve-se fazer uso de antibióticos de largo espectro.

Em geral, os sintomas melhoram dentro de 48h após a administração de um tratamento eficiente, em casos agudos ou crônicos discretos. A contagem de plaquetas deve aumentar em 2 a 7 dias, estabilizando-se em 4 até 8 semanas, caso a infecção tenha sido eliminada. A hiperglobulinemia também deve regredir de forma gradativa em 6 a 9 meses, mesmo período em que a maior parte dos cães se torna soronegativa, após a eliminação da infecção.

O prognóstico para a erliquiose canina é excelente quando instaurado um tratamento apropriado, a menos que a medula óssea fique severamente hipoplásica, neste caso o prognóstico torna-se reservado. Cães com doença crônica grave associada a pancitopenia ou anemia aplásica podem demorar meses para conseguir recuperação hematológica completa e, em alguns casos, a pancitopenia grave pode ser fatal (COUTO, 2003; SHERDING, 2008).

3. APLASIA MEDULAR

A aplasia medular é uma doença congênita (ocorre devido a um fator genético), ou adquirida (causada pela utilização de certos medicamentos ou drogas ilícitas), caracterizada pela deficiência medular, ou seja, disfunção da medula óssea, sendo tal doença separada em dois níveis, a moderada e a grave (BRANCO, Millena *et al*, 2009).

A avaliação de medula óssea é indicada quando são detectadas alterações em sangue periférico incapazes de serem explicadas em um hemograma (GRINDEM *et al.*, 2002). As indicações mais comuns incluem neutropenia ou trombocitopenia persistentes, trombocitose ou policitemia inexplicadas, anemias arregenerativas ou uma combinação de algumas destas informações, além da presença de células atípicas em sangue periférico (HARVEY, 2001; WILLARD e TVEDTEN, 2004). Outras situações nas quais o mielograma é indicado são em casos de reações celulares atípicas, hiperproteinemia secundária a gamopatia monoclonal, hipercalcemia inexplicada, mieloma múltiplo ou metástases em medula óssea (HARVEY, 2001; GRINDEM *et al.*, 2002).

A frequência das causas de pancitopenia e aplasia medular varia de acordo com a região. Embora na maioria das vezes a pancitopenia seja atribuída à erliquiose em nosso meio, nem sempre é possível confirmar a causa desta condição. (MORAES, Lívia, 2010).

A anemia aplástica é na realidade uma hipoplasia medular e não uma aplasia propriamente dita, o que seria incompatível com a vida (WILLIAMS, 1998; YOUNG, 2002; PITA *et al.*, 2008). É uma doença caracterizada pela deficiência na produção de células sanguíneas pela medula óssea, dificultando a produção destas e a doença pode ser classificada em dois níveis, de acordo com suas manifestações clínicas: moderada e grave. A hematopoese é a produção das células sanguíneas na medula óssea, o processo inicia-se a partir de uma stem cell (célula tronco). Na aplasia medular ocorre a pancitopenia (diminuição da produção dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas), sem evidências de células imaturas ou malignas invadindo o tecido hematopoiético e deficiência de vitamina B12, folatos, ferro e outras substâncias hemoformadoras (WILLIAMS, 1998; YOUNG, 2002; PITA *et al.*, 2008).

4. CÉLULAS TRONCO

Na última década, destacou-se um novo ramo da Medicina Veterinária designado por Medicina Regenerativa Veterinária. Esta área aplica os princípios das ciências da saúde, da biologia e da engenharia, com o intuito de obter substitutos biológicos que mantenham, melhorem ou restaurem as funções de órgãos e de tecidos do organismo (LUNA, 2007; BAJADA et al., 2008; Regenera Stem Cells, 2015).

A terapia celular é um conjunto de métodos e abordagens tecnológicas que propõe a transferência de células com fins terapêuticos para diversas doenças com a expectativa de que estas proliferem, se diferenciem ou segreguem fatores que promovam a regeneração dos tecidos lesados. Quando realizada, produz uma série de fatores que podem ser a favor ou contra o processo (SINGH & WILLIAMS 2008; ROCHA et al., 2012; MÜLLER, 2013; ERIDANI, 2014)

Todas as células presentes no corpo adulto, derivam de uma célula tronco, a célula ovo ou zigoto, que por divisões e diferenciações sucessivas, gera células especializadas como as da pele, dos ossos, das cartilagens, do sangue, dos músculos e do sistema nervoso. O potencial de diferenciação e de auto renovação faz com que os cientistas busquem nas células tronco a possibilidade de encontrar a cura para muitas doenças, a partir de terapias que possibilitam o reparo de tecidos ou órgãos danificados por grupos de célula tronco. (GONÇALVES;. 2010)

O sistema hematopoiético é formado por órgãos hemoformadores (medula óssea, gânglios linfáticos, baço e fígado), sendo, nos adultos, o principal, a camada medular do esterno, e osso ilíaco o qual contem a medula óssea constituída pelo estroma e células hematopoiéticas as quais originam-se de células-tronco (stem cell) (OLIVEIRA, 1990; ZANICHELLI et al., 1995; JAMRA, LORENZI, 1997; GOLDESTINE, 1998).

Parte deste sistema também é o sangue, o qual é formado por uma porção líquida, denominada plasma e por células em suspensão, denominadas eritrócitos, leucócitos e plaquetas, os quais devem circular em concentrações diferenciadas, permitindo elaborar suas funções no organismo (GOLDESTINE, 1998).

No animal adulto normal são produzidos diariamente cerca de $2,5 \times 10^9$ eritrócitos, 1×10^9 granulócitos e $2,5 \times 10^9$ plaquetas por grama de peso corporal. (Thrall, 2005)

A medula óssea vermelha também é um tipo especial de tecido conjuntivo altamente vascularizado, formado principalmente por fibras reticulares, que fornecem sustentação e células hematopoiéticas. Ela está presente nas cavidades medulares dos

ossos sendo que nas crianças é encontrada na maioria dos ossos e nos adultos sua quantidade diminui, estando presente nos ossos chatos do corpo (esterno, costelas, ossos do crânio), nas vértebras, nos ossos pélvicos, na tíbia, na clavícula, nas epífises do fêmur e do úmero (ossos longos). Nos adultos ocorrem 2 tipos de medula óssea: a vermelha e a amarela. A medula óssea vermelha é a hematopoética, sua cor é devida a quantidade de eritrócitos e seus precursores. A medida que vai envelhecendo, este tipo de medula é progressivamente substituída por gordura, tornando-se amarela.

Entretanto, caso haja necessidade de se aumentar a produção de sangue a medula óssea amarela pode voltar a se tornar vermelha. Na medula vermelha ocorrem três populações principais de células tronco: célula tronco hematopoéticas; células progenitoras comprometidas e células em amadurecimento. A célula tronco hematopoética é multipotente, pequena e mononucleada, com potencial para diferenciar-se em qualquer célula sanguínea. (GONÇALVES; BRANCALÃO. 2010)

Em 2001, as células estaminais mesenquimatosas derivadas do tecido adiposo foram isoladas, pela primeira vez, a partir de um lipoaspirado humano. Posteriormente, esta fonte celular foi alvo de enorme interesse pela comunidade científica. (ZUK et al., 2001; SPENCER & LOPEZ, 2011; FILHO *et al.*, 2013; REQUICHA, 2013). Quando comparadas com as células tronco derivadas da medula óssea, as células tronco derivadas do tecido adiposo são igualmente capazes de se diferenciar em células e tecidos de origem mesodérmica (BAJADA et al., 2008; MARTINELLO et al., 2011).

O tecido adiposo canino fornece uma fonte alternativa de células tronco com uma grande capacidade de diferenciação e com a vantagem de não induzirem resposta inflamatória exuberante no hospedeiro transplantado (REQUICHA *et al.*, 2012).

Em animais de companhia, o tecido adiposo pode ser facilmente obtido através de uma incisão cirúrgica na região inguinal, abdominal e/ou parede torácica, sem apresentar grandes riscos para a saúde do animal. Além disso, os procedimentos de rotina realizados em clínicas e hospitais veterinários, como orquiectomias, ovariectomias e cesarianas, podem favorecer um processo simples de obtenção deste material, sem que haja a necessidade de intervenções exclusivas para esta finalidade (VIDAL et al., 2007; MAMBELLI et al., 2009; MARTINELLO et al., 2011).

O isolamento de células tronco derivadas do tecido adiposo é realizado através de processos de digestão enzimática do tecido com enzimas como a colagenase. O tecido adiposo digerido é composto por células tronco de origem mesenquimatosa, células endoteliais, monócitos, macrófagos, mastócitos, pré-adipócitos, fibroblastos e

células musculares. O uso terapêutico desta fração celular mista pode oferecer benefícios para o animal, porém o número de células tronco de origem mesodérmica, bem como de todos os componentes celulares da fração vascular é variável entre indivíduos (ZUK *et al.*, 2001; MAMBELLI *et al.*, 2009; RIORDAN *et al.*, 2009).

O papel das células tronco adiposas na Medicina Regenerativa pode estar mais relacionada à sua capacidade de modular a imunidade e/ou inflamação, do que para os seus potenciais de diferenciação (BAJADA *et al.*, 2008; SPENCER & LOPEZ, 2011; FILHO *et al.*, 2013).

O uso terapêutico das células tronco ainda é questionado pela falta de protocolos, tanto sobre a melhor forma de isolamento, vias (intravenosa ou intralesional) e doses de administração para cada problema em específico. Sabe-se que as células tronco possuem a capacidade de migrar até aos órgãos e tecidos lesados (biodistribuição) e, além disso, usufruem de fortes propriedades imunomoduladoras (Le blanc & Pittenger, 2005). Estudos demonstraram a ação parácrina das células tronco através da secreção de citocinas. Esta ação influencia as células adjacentes, aumentando a sobrevivência celular e ativando mecanismos endógenos de regeneração (GNECCHI *et al.*, 2008; BURDON *et al.*, 2011).

As CTA são denominadas multipotentes e, ao contrário do que se acreditava inicialmente, não estão envolvidas apenas no processo de reparação e homeostase dos tecidos dos quais são isoladas, mas também possuem diversos efeitos parácrinos, que contribuem para a recuperação e a regeneração de outros tipos celulares e tecidos do organismo (SOUZA *et al.* 2010), pois essas células produzem e secretam uma ampla variedade de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento que atuam de forma parácrina na regeneração do tecido *in vivo* (CAPLAN & DENNIS, 2008).

Para que uma população de células seja considerada célula tronco, ela deve obedecer a no mínimo três pré-requisitos segundo a International Society for Cellular Therapy: 1. Serem plásticas-aderentes quando mantidas em condições de cultura; 2. Serem positivas para CD105, CD73 e CD90, e 3. negativas para CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 ou CD19 e HLA-DR (DOMINIC; LE BLANCK, MÜLLER, 2006). Contudo, dependendo da fonte da qual são obtidas, métodos de isolamento celular e características da cultura, a expressão desses marcadores pode ocorrer de forma variada. As células tronco adultas também podem expressar outras proteínas de superfície como: CD44, CD71 (receptor de transferrina), Stro-1, fibronectina, vimentina, CD73 (ecto-5'-nucleotidase, SH3 e SH4), entre outras. (GRONTHOS *et al.*, 2001; SABATINI *et al.* ,

2005). Ainda são necessários mais estudos para elucidar a variabilidade de expressão de diversos marcadores serem capazes de se diferenciarem em osteoblastos, condrócitos e adipócitos (DOMINIC; LE BLANCK, MÜLLER, 2006).

Como visto anteriormente, a medula óssea é a fonte mais comum de células tronco, porém populações similares também foram obtidas de outras fontes, como o sangue do cordão umbilical, placenta, líquido amniótico, derme, fígado, baço (BIANCO & COSSU; 1999), polpa dentária (KERKIS *et al*, 2012) e tecido adiposo (ZUK, 2001). Dentre essas fontes, destaca-se o tecido adiposo, que oferece mais vantagens, em comparação a outras fontes, por apresentar baixo risco para doadores, elevado número de células tronco maduras (é possível coletar de 100 mL até 1 L de tecido adiposo) e por ser capaz de manter seu potencial proliferativo de oito a dez passagens sem qualquer deterioração detectável em sua capacidade de autorrenovação, além da ausência de rejeição imunológica (GRUBER *et al*, 2012).

O tecido adiposo é de origem mesodérmica e contém uma população celular estromal heterogênea. O mesoderma surge durante a gastrulação como camada média, entre o endoderma e ectoderma. O mesoderma embrionário dá origem a vários tipos de músculos incluindo o cardíaco, todo tecido conjuntivo, os vasos sanguíneos e o sangue e vasos linfáticos (ZUK *et al*, 2001).

Segundo Zannettino *et al* (2010), o nicho das células tronco de tecido adiposo localiza-se na região perivascular, sendo composto pelos vasos sanguíneos em associação com células de tecido conjuntivo, adiposas, estromais, diversos progenitores e célula tronco.

A *International Fat Applied Technology Society* (IFATS) propôs, em Pittsburgh, uma nomenclatura padronizada em 2004, adotando o termo “ASC” do inglês “*adipose stem cells*”, para se referir à população de células multipotentes aderentes isoladas da fração do estroma vascular (DAHER *et al*, 2008) As células tronco maduras do tecido adiposo foram isoladas e caracterizadas em humanos e em espécies animais (BIANCO & COSSU, 1999).

Similarmente à medula óssea, as células tronco do tecido adiposo têm um amplo potencial de diferenciação nos variados tipos celulares, como adipogênica, condrogênica, osteogênica, miogênica, angiogênica, neurogênica, miogênica e cardiomiogênica (STREM *et al*, 2005). No entanto, a taxa de sucesso de isolamento é de 100% e o rendimento do tecido adiposo é 40 vezes maior que a medula óssea (KERN *et al*, 2006). Além disso, a quantidade de células não parece diminuir com a idade, tornando

esse tipo de célula atraente para o isolamento de células tronco mesenquimais e progenitores (DIMUZO et al., 2007).

As células tronco são assim fundamentais no desenvolvimento e na manutenção da vida e, por isso, se apresentam distribuídas no corpo adulto, como ocorre no interior das cavidades de ossos, onde encontramos as células tronco hematopoéticas que originam todas as células sanguíneas e também são capazes de originar células não sanguíneas, como células musculares estriadas cardíacas, células musculares lisas, e células endoteliais. (GONÇALVES; BRANCALÃO, 2010)

Para compreender todos os aspectos das células tronco hematopoéticas é necessário analisar de forma ampla e sequencial suas características morfológicas e funcionais, bem como os benefícios que podem trazer para a humanidade. (GONÇALVES; BRANCALÃO, 2010)

5. APRESENTAÇÃO DO CASO CLÍNICO

5.1. RELATO DE CASO

Um cão, da raça Buldog Francês, com 4 anos e 6 meses, pesando 10,6kg foi atendido em uma clínica em Campina Grande – PB, apresentando dermatite severa. A tutora relatou, que o animal havia sido diagnosticado para Erliquiose há dois meses, porém, ele que não apresentava melhora. Após análise terapêutica, verificou-se que o animal estava sendo tratado com subdose de doxiciclina, advindo de tratamento inadequado por parte do outro profissional.



Figura 3: Paciente Buldog Frânces apresentando dermatopatia generalizada.

Então foram solicitados exames laboratoriais complementares, tais como: eritrograma, leucograma e plaquetograma e teste da ponta de orelha, a fim de confirmar o diagnóstico e a queixa principal da tutora, a qual foi confirmada. Dessa maneira, a dose de Doxiciclina foi reajustada e adicionado ao protocolo Omeprazol (Gaviz® 10mg), como também, o tratamento para dermatite, uma vez que suspeitávamos que a causa primária da dermatite seria a Erliquiose. No segundo encontro, o animal retornou, apresentava vômitos após a administração do medicamento, sendo adicionado a sua terapêutica o Ondrasetona (Vonau® 4mg), Suplemento Nutricional (Glicopet®), e manteve a Doxiciclina (Doxifin® 100mg) e omeprazol (Gaviz® 10mg), por mais 16

dias. No terceiro encontro, o animal retorna com uma piora significativa quanto ao problema de pele. Seu leucograma apresentava piora significativa quanto ao seu problema de pele. Seu hemograma apresentava Anemia Microcítica Hipocrômica Arregenerativa. Leucopenia por Eosinopenia, Linfopenia, Monocitopenia Absolutas e Trombocitopenia. (Ver tabela 1).

Data	3º encontro	Valores de Referência
	27/01/2016	
Hematimetria (x10 ¹² /L)	4,73	5,5 – 8,5
Hemoglobina (g/L)	106	120 - 180
Volume Globular (L/L)	0,38	0,37 – 0,55
VGM (fL)	22,8	60 – 77
CHGM	27,8	32 – 36,
Plaquetas	22	200 - 500
Leucócitos (x10/L)	2,5	6 – 17
Eosinófilos	0,07	0,1 – 1,25
Linfócitos	0,4	1 – 4,8
Monócitos	0,1	0,15 – 1,35
Granulócitos (Neutrófilos)	2,0	3 – 11,5

Tabela 1

Então iniciou-se um tratamento para a pele com imunoestimulante Timerovac com Células inativadas de *Propionibacterium acnes* (Infervac® 1ml), com aplicações semanais, Timodulina (Leucogem® 80mg), Ivermectina (Metamax®), banhos com sabonete Protex e Clorexidina 3g (Hexadene® sepullites™), como também, foi realizado um exame para diagnóstico de *Leshmania* (coleta da medula óssea – exame PCR), o qual foi negativo para tal. No quarto encontro o paciente apresentou o resultado do Hemograma inalterado. (ver tabela 2), com melhora clínica em sua pele.

Data	4º encontro	Valores de Referência
	24/02/2016	
Hematimetria (x10 ¹² /L)	3,2	5,5 – 8,5
Hemoglobina (g/L)	102	120 - 180
Volume Globular (L/L)	0,43	0,37 – 0,55
VGM (fL)	51,6	60 – 77
CHGM	21,3	32 – 36,
Plaquetas	38	200 - 500
Leucócitos (x10/L)	0,7	6 – 17
Eosinófilos	0,01	0,1 – 1,25
Linfócitos	0,2	1 – 4,8
Monócitos	0,6	0,15 – 1,35
Granulócitos (Neutrófilos)	0,5	3 – 11,5

Tabela 2

No quinto encontro, Bruce retorna apático, com mucosas pálidas e inapetente, ao realizar novamente o hemograma, Leucograma e Plaquetograma, apresentaram-se Anemia Microcítica Hipocrômica Arregenerativa. Leucopenia por Eosinopenia, Linfopenia, Monocitopenia e Trombocitopenia (ver tabela 3).

Data	5º encontro	Valores de Referência
	23/04/2016	
Hematimetria ($\times 10^{12}/L$)	3,2	5,5 – 8,5
Hemoglobina (g/L)	102	120 - 180
Volume Globular (L/L)	0,43	0,37 – 0,55
VGM (fL)	51,6	60 – 77
CHGM	21,3	32 – 36,
Plaquetas	38	200 - 500
Leucócitos ($\times 10/L$)	0,7	6 – 17
Eosinófilos	0,01	0,1 – 1,25
Linfócitos	0,2	1 – 4,8
Monócitos	0,6	0,15 – 1,35
Granulócitos (Neutrófilos)	0,5	3 – 11,5

Tabela 3

Então foi feita coleta sanguínea para exame tumoral através do Antígeno Prostático Específico pela técnica de eletroquimioluminescência, resultando em 0,01mg/ml (negativo), onde o valor de referência é de até 2,50mg/ml, bem como, coleta de soro para o CEA – Antígeno Carcino-Embrionário, onde resultou em 0,50mg/ml (negativo), onde o valor de referência é inferior ou igual a 5,00mg/ml, através da técnica eletroquimioluminescência. Também foi realizada uma punção aspirativa de medula esternal, o qual foi observado hipocelularidade severa, compatível com hipoplasia mielóide intensa, hipoplasia eritrocitária e hipoplasia megacariocítica. Então diante do quadro clínico, iniciou-se um tratamento à base de Carbonato de Lítio 4mg/kg, durante 30 dias, sendo monitorado através da contagem de Carbonato de Lítio Sérico, devido aos seus efeitos colaterais, onde o resultado encontrado foi de 0,4mmol/L, o qual do valor terapêutico é entre 0,6 a 1,2 mmol/L, medido através do método do colorimétrico.

Também foram realizados exames bioquímicos de Ureia, ALT (Alanina Aminotransferase), FA (Fosfatase Alcalina), Creatinina, onde os mesmos deram dos padrões normais (ver tabela 4).

Exames	5º encontro	Valores de Referência
FA	50	10 – 92
ALT (UI)	11	10 – 88
Creatinina (mg/dL)	0,7	0,5 – 1,5
Ureia (mg/dL)	34,1	15 – 40

Tabela 4

No sexto encontro, além da transfusão sanguínea, foi retirado um fragmento de tecido adiposo do animal, com auxílio de um punch, e enviado para um laboratório em São Paulo, para uma clínica de cultivos celular, objetivando a produção de células tronco para tratamento da hipoplasia medular, pois, é a partir desse tecido que é produzida as células tronco, como já citado no capítulo anterior.

Quase um mês após o último hemograma, foi realizado um novo hemograma e eritrograma apresentaram valores dentro das normalidades. (Ver tabela 5).

Data	7º encontro	Valores de Referência
	22/05/2016	
Hematimetria ($\times 10^{12}/L$)	6,34	5,5 – 8,5
Hemoglobina (g/L)	153	120 – 180
Volume Globular (L/L)	0,49	0,37 – 0,55
VGM (fL)	24,4	60 – 77
CHGM	30,8	32 – 36,
Plaquetas	328	200 - 500
Leucócitos ($\times 10/L$)	0,9	6 – 17
Eosinófilos	0,04	0,1 – 1,25
Linfócitos	1,6	1 – 4,8
Monócitos	0,5	0,15 – 1,35
Granulócitos (Neutrofilos)	6,9	3 – 11,5

Tabela 5

Então no dia 25/05/2016 foi realizada a primeira aplicação de células tronco, feitas a partir do tecido adiposo do animal, onde foi injetado 1 ml de células tronco dissolvidas em 5 ml de Solução fisiológica em por via endovenosa. No dia 02/06/2016, foi realizado exames de Hemograma, Leucograma e um Plaquetograma, onde os resultados foram: Anemia Microcítica Hipocrômica regenerativa. Leucopenia por Eosinopenia, Linfopenia, Monocitopenia Absolutas e Trombocitopenia (Ver tabela 6).

Data	8º encontro	Valores de Referência
	02/06/2016	
Hematimetria ($\times 10^{12}/L$)	2,11	5,5 – 8,5
Hemoglobina (g/L)	45	120 – 180
Volume Globular (L/L)	0,16	0,37 – 0,55
VGM (fL)	21,3	60 – 77
CHGM	26,6	32 – 36,
Plaquetas	58	200 – 500
Leucócitos ($\times 10/L$)	4,9	6 – 17
Eosinófilos	0,17	0,1 – 1,25
Linfócitos	1,1	1 – 4,8
Monócitos	0,3	0,15 – 1,35
Granulócitos (Neutrofilos)	3,5	3 – 11,5

Tabela 6

Por fim, vinte e um dias após a primeira aplicação das células tronco, houve a segunda aplicação, com a mesma quantidade e concentração da primeira dose, porém após 24h a aplicação, o animal teve parada cardiorrespiratória e morreu. Porém, antes de morrer foi realizado mais um hemograma completo e apresentou os seguintes valores: Leucócitos $11.500,00 \times 10^9/L$, VG de 11,8%, Hemácias de $6,8 \times 10^6/u/L$ e Plaqueta de 6000 mm^3 . Sendo assim, o tratamento com células tronco não foi responsivo para este caso.

6. DISCUSSÃO

O diagnóstico de Ehrlichiose surgiu devido às alterações observadas pelo resultado do hemograma, através da anemia microcítica hipocrômica regenerativa, e Leucopenia com DNNE por linfocitopênia e monocitopenia absolutas degenerativas, e trombocitopenia, além de ter encontrado Corpúsculo de Inclusão “mórulas” nos monócitos no teste de ponta de orelha. Analisando-se os resultados de primeiro hemograma (27/01/2016), observou-se uma anemia severa através do baixo valor do hematócrito. No leucograma observou-se desvio dos neutrófilos à esquerda, indicando ser degenerativa a leucopenia, que poderia ser explicado pela instalação de um processo infeccioso no organismo do animal, reforçado pela constatação da leucopenia e neutropenia. Contudo, a presença de monocitopenia reforçava estes achados.

A linfopenia pode ocorrer em situações de estresse, inflamações, doenças debilitantes ou infecções virais. Segundo Breitschwerdt (2004), na fase aguda da erliquiose pode ocorrer a formação de anticorpos eritrocitários, que contribuem para uma crise hemolítica aguda, resultando em uma anemia regenerativa, porém não foi no caso em questão. Devido ao baixo valor de hematócrito, foi efetuada transfusão sanguínea, conforme recomendado por Cohn (2003). Mesmo após a realização de transfusão sanguínea, o valor do hematócrito permaneceu baixo, o que pode indicar que a causa da anemia permanecia atuando, fazendo com que o animal continuasse a perder eritrócitos.

Foram então solicitados exames de dosagem de uréia e creatinina para avaliar a função renal. Com relação aos exames bioquímicos realizados na mesma data, observaram-se resultados dentro dos valores normais, não indicando comprometimento renal ou hepático, em primeira análise.

Observou-se também trombocitopenia. Segundo Breitschwerdt (2004), a trombocitopenia é a alteração hematológica mais consistente na erliquiose aguda ou crônica. Como citado em WEISS, (2000), foi observada, linfopenia.

Diante desses achados, passou-se a suspeitar de erliquiose. Solicitou-se pesquisa de hematozoários, e deu-se início ao tratamento contra esta doença. Segundo Cohn (2003), cães com sinais clínicos sugestivos e anormalidades laboratoriais compatíveis podem iniciar com o tratamento mesmo sem a realização de exames específicos. O tratamento instituído (doxiciclina 10 mg/kg, BID., por 21 dias) preconizado pelo autor Breitschwerdt (2004). Segundo o mesmo autor, poder-se-ia também administrar

tetraciclina 22 mg/kg, TID, por 14 dias. Outra alternativa (COUTO; NELSON, 1998) seria o Omeprazol, uma vez ao dia, durante 21 dias.

Prescreveu-se também para o tratamento para a pele com Timerovac com Células inativadas de *Propionibacterium acnes*, com aplicações semanais, Timodulina uma vez por semana e banhos com sabonete Protex e Clorexidina 3g duas vezes por semana.

Apesar de Breitschwerdt (2004) relatar que as mórulas são observadas ocasionalmente durante a fase inicial da infecção e raramente em infecções crônicas, neste caso as mesmas puderam ser visualizadas.

Mesmo após o tratamento indicado pelas literaturas, já citadas anteriormente, não se percebeu melhora no quadro da pancitopenia do animal, o qual se fez necessário uma punção aspirativa no externo do animal, que veio a comprovar a pancitopenia celular, o que levou a pesquisa de tratamento alternativo para este quadro.

Então, como alternativa na tentativa de sanar essa enfermidade, foi indicado transplante de células tronco a partir do próprio tecido adiposo do animal, onde a priori seriam realizadas 3 aplicações, intercaladas, isto é, a cada 21 dias, porém mesmo com uma melhora mínimas após a primeira aplicação, 24 horas após a segunda aplicação o animal morreu devido a uma parada cardiorrespiratória. Para ver os valores dos hemogramas e compara-los, ver tabela 7.

Logo, há uma forte inclinação a nos levar a afirmar que a morte deste animal se deu pelo fato de que o tratamento realizado com células tronco tenha sido tardio, isto é, após vários tratamentos como já citado anteriormente, uma vez que, este animal já teria vindo de um tratamento anterior com falha em sua terapêutica há mais de dois meses. Porém, os que nos leva a não poder afirmar com veemência que o animal teria sobrevivido ao tratamento se tivesse sido realizado em tempo hábil é o fato de não haver dados/ referências sobre até que ponto (nível de aplasia), essa terapêutica seria eficaz. L

Data	27/01/2016	24/02/2016	23/04/2016	22/05/2016	02/06/2016	Valores de Referência
	3º encontro	4º encontro	5º encontro	7º encontro	8º encontro	
Hematimetria (x10 ¹² /L)	4,73	3,2	1,59	6,34	2,11	5,5 – 8,5
Hemoglobina (g/L)	106	102	35	153	45	120 - 180
Volume Globular (L/L)	0,38	0,43	0,12	0,49	0,16	0,37 – 0,55
VGM (fL)	22,8	51,6	22	24,4	21,3	60 – 77
CHGM	27,8	21,3	26	30,8	26,6	32 – 36,
Plaquetas	22	38	20	328	58	200 - 500
Leucócitos (x10/L)	2,5	0,7	0,6	0,9	4,9	6 – 17
Eosinófilos	0,07	0,01	0,01	0,04	0,17	0,1 – 1,25
Linfócitos	0,4	0,2	0,1	1,6	1,1	1 – 4,8
Monócitos	0,1	0,6	0,1	0,5	0,3	0,15 – 1,35
Granulócitos (Neutrófilos)	2,0	0,5	0,4	6,9	3,5	3 – 11,5
FA	-	-	50	-	-	10 – 92
ALT (UI)	-	-	11	-	-	10 – 88
Creatinina (mg/dL)	-	-	0,7	-	-	0,5 – 1,5
Ureia (mg/dL)	-	-	34,1	-	-	15 – 40

Tabela 7

7. CONCLUSÃO

Podendo ser considerada como uma linha de pesquisa recente na área da Medicina Veterinária, a terapias com células tronco ainda se torna inacessível para grande parte da população animal enferma, uma vez que, esse tratamento requer um valor financeiro bem elevado.

O fato de não haver estatísticas sobre a terapêutica com células tronco em animais, é o fator que mais dificultou dados sobre a taxa de sobrevivência e mortalidade de animais que utilizam essa terapêutica como objeto da cura de suas enfermidades.

Ao observarmos os exames do paciente em estudo, vemos uma leve recuperação das células medulares, porém tudo leva a crer que, o tratamento tardio não permitiu que sua enfermidade tenha sido sanada. Então partindo desse ponto de vista, nos leva a várias inquietações, tais como: até que grau de enfermidade essa terapêutica responde com eficácia? Qual é a dose ideal para cada doença em específicas? Qual o melhor tipo de isolamento celular e para qual doença? Qual a melhor via de transplante, a escleral ou a endovenosa? Ou se há uma terceira via melhor? Qual a dose ideal para transplantar em cada doença?

Logo, se faz necessário, estudos mais aprofundados para que amplie o leque de conhecimentos, pois ainda há bastante enfermidades a serem elucidadas, que possam a serem estacionadas, melhoradas ou sanadas com novas descobertas nessa área, pois tais conhecimento não só traz benefícios aos animais, mas também ao homem, a exemplo de outros estudos.

5. BIBLIOGRAFIA

- 1 - BYDLOWSKI, S. P., DEBES, A. A., MASELLI, L. M. F., & Janz, F. L. (2009). Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Revista Brasileira de Hematologia E Hemoterapia*, V.31, P. 25–35. <http://doi.org/10.1590/S1516-84842009005000038>
- 2 - MALARD, P. F., Veterinária, M., Cell, B. I. O., Celular, T., Xavier, C., Veterinário, M., ... Bosco, D. (n.d.). **Hipoplasia Medular Eritroide Imunomedia Tratada com Células-Tronco Mesenquimais – Relato de caso**, (3), P. 4–6.
- 3 - MORAES, L. F., & TAKAHIRA, R. K. (2010). Aplasia Medular em Cães. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, V. 9(1), P. 99–108.
- 4 - BYDLOWSKI, S. P., DEBES, A. A., MASELLI, L. M. F., & JANZ, F. L. (2009). Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Revista Brasileira de Hematologia E Hemoterapia*, V. 31, P. 25–35. <http://doi.org/10.1590/S1516-84842009005000038>
- 5 - MALARD, P. F., Veterinária, M., Cell, B. I. O., Celular, T., Xavier, C., Veterinário, M., ... Bosco, D. (n.d.). **Hipoplasia Medular Eritroide Imunomedia Tratada com Células-Tronco Mesenquimais – Relato de caso**, Nº (3), P. 4–6.
- 6 - MORAES, L. F., & TAKAHIRA, R. K. (2010). Aplasia Medular em Cães. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, 9(1), 99–108.
- 7 - FELDMAN B F. Nonregenerative anemia. In: ETTINGER S J., FELDMAN E C. **Textbook of veterinary internal medicine**. 6. ed. St. Louis: Elsevier Saunders, V. 2 2005. P. 1913- 1916.
- 8 - LUCIDI, C. A., TAKAHIRA R. K. **Uso do estimulante de colônia de granulócitos nas neutropenias em cães e gatos**. *Ciência Rural*, Santa Maria, V.37, P. 915-920, 2007.

- 9 - WEISS D J. New insights into the physiology and treatment of acquired myelodysplastic syndromes and aplastic pancytopenia. **The Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, Philadelphia, V.33, P. 1317- 1334, 2003.
- 10 - BRANDÃO, L. **Hemoparasitoses em cães e gatos: aspectos clínicos e laboratoriais.** Merial Saúde Animal, 2010. Disponível em: <http://www.tecsa.com.br/media/file/pdfs/palestras%20Jornada%20PET/Diag_%20e%20tratamento%20das%20Hemoparasitoses%20Dr%20Leonardo%20Brandao%202010.pdf> Em: 23/07/2016
- 11 - BULLA, C.; TAKAHIRA, R.K.; ARAUJO JR, J.P.; TRINCA, L.A.; LOPES, R.S.; WEIDMEYER, C.E. **The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with Ehrlichia canis in na endemic área.** Veterinary Research, V.35, P:141-146, 2004a.
- 12 - MASSARD, C.L.; FONSECA, A.H. **Carrapatos e doença transmitidas, comuns ao homem e aos animais.** A Hora Veterinária, ano 23, N.137, P.15-23, 2004.
- 13 - PEREIRA, J.C. **Erlichiose canina.** Monografia de Especialização em Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais, Universidade Castelo Branco, São José do Rio Preto, São Paulo, 2006, 20p
- 14 – SERGIO, P. BYDLOWSKI, ADRIANA, A. DEBES, LUCIANA M. F. Maselli FELIPE L. JANZ. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.** 31, 21-30.
- 15 - SSHWINDT, *et al.* Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco – Artigo de Revisão. **Jornal Brasileiro de Neurocirurgia.** V. 16. P.13-19.
- 16 - ANTONIO, N.S.; OLIVEIRA, A.C.; ZAPPA, V. Babesia canis: relato de caso. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, ano VII, n.12, Janeiro de 2009.
- 17 - BULLA, C.; TAKAHIRA, R.K.; ARAUJO JR, J.P.; TRINCA, L.A.; LOPES, R.S.; WEIDMEYER, C.E. **The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with Ehrlichia canis in na endemic área.** Veterinary Research, v.35, p:141-146, 2004.

- 18 - DUMLER, J.S.; BARBET, A.F.; BEKKER, C.P.J.; DASH, G.A.; PALMER, G.H.; RAY, S.C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F.R.. **Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, description of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and ‘HGE agent’ as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p:2145-2165, 2001.
- 19 - TAKAHIRA, R. **Babesiose e hemobartonelose**. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, São Paulo, 2010.
- 20 - ALBERT, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia molecular da célula**. Artmed.São Paulo. Ed. 4. 2004.
- 21 - VOLTARELLI, J. C. Transplante de células-tronco hematopoiéticas para doenças auto-imunes no Brasil. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** N. (24) P. 9-13. 2002.
- 24 - COWELL, R. L.; TYLER, R. D.; MEINKOTH, J. H.; DENICOLA D. B.; **Diagnóstico citológico e hematologia de cães e gatos**. Saunders 2009
- 25 – MALARD, Patrícia Furtdo. Hipoplasia Medular Eritroide Imunomedia Tratada com Células-Tronco Mesenquimais – Relato de caso. **Revista Bio Cell Terapia Celular**. (1) 2016.
- 26 – CASTILHOS, Bruno de Queiroz. **MIELOGRAMA: AVALIAÇÃO LABORATORIAL E APRESENTAÇÃO DE CASO CLÍNICO**. Monografia. Curitiba.